

06-077694/12 804 D16 S03 TAKE 15.02.84  
 TAKEDA CHEMICAL IND KK \*J6 0169-495-A  
 15.02.84-JF-027775 (02.09.85) C07h-21/04 C12n-15 G01n-33/53  
 New poly:de:oxy:nucleotide for diagnosing hepatitis B etc. - obtd. by  
 linking hapten to phosphoric acid portion opt. via ligand  
 C86-033074

A novel polydeoxynucleotide (I) is obtd. by linking a hapten to the 5' terminal phosphoric acid portion directly or via a ligand.

#### USE

For detecting a specific base sequence in a polynucleotide (PN) by hybridizing (I) with PN in cells or fixed to a support introducing fluorescence or enzyme label to the resulting hybrid immunologically, and detecting the photoresponse generated by photoexcitation or substrate addition.

Genes of HBV, ATLAV or HLA can be detected, and the method is valuable in diagnosis of hepatitis B and adult leukaemia.

#### HAPTEN

Suitable haptens are 2,4-dinitrophenyl, biotinoyl, aldosterone, testosterone and diphenylhydantoin.

The hapten is pref. bonded to the 5' terminal phosphoric

B(4-B4A1, 12-K4A1, 12-K4A4) D(5-H6, 5-H9, 5-H12)

acid portion of a polydeoxynucleotide via a ligand, e.g. -A-Z(A = bond or -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-; X = O, NH or bond; Z = O or NH); particularly suitable is -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH-.

#### DETECTION PROCEDURE

PN to be detected is fixed to a support such as nitro-cellulose filter in conventional manner, and if desired denatured with alkali or by heating to form a single chain PN.

The filter contg. fixed PN is hybridized with (I) in a buffer, reacted with anti-hapten IgG or antiserum, then further reacted with enzyme- or fluorescence-labelled anti-IgG antibody.

Substrate is suitable hydrogen peroxide, and dye is e.g. ortho-dianisidine. (5ppW108DAHDwgNo0/0).

J60169495-A

© 1986 DERWENT PUBLICATIONS LTD.

128, Theobalds Road, London WC1X 8RP, England

US Office: Derwent Inc. Suite 500, 6845 Elm St. McLean, VA 22101

Unauthorised copying of this abstract not permitted.

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭60-169495

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)9月2日

C 07 H 21/04

7252-4C

C 12 N 15/00

7115-4B

G 01 N 33/53

7906-2G

// A 61 K 39/295

7043-4C

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑮ 発明の名称 変性されたDNAおよびその用途

⑯ 特 願 昭59-27775

⑰ 出 願 昭59(1984)2月15日

⑱ 発 明 者 福 田 常 彦 京都市西京区大原野西境谷町2-9番10-202号

⑲ 発 明 者 丸 本 龍 二 芦屋市奥池南町53番1号

⑳ 出 願 人 武田薬品工業株式会社 大阪市東区道修町2丁目27番地

㉑ 代 理 人 弁理士 天 井 作 次

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

変性されたDNAおよびその用途

## 2. 特許請求の範囲

(1) 5'末端のリン酸部に直接またはリガンドを経  
てハプタンを結合せしめてなるポリデオキシヌク  
レオチド。(2) 5'末端のリン酸部に直接またはリガンドを経  
てハプタンを結合せしめてなるポリデオキシヌク  
レオチドを、細胞中あるいは支持体に固定された  
試料中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせ、  
該ハイブリッドに免疫学的手法で蛍光または酵素標  
識を導入し、光検起または基質添加によつて生じ  
る光応答を検知することを特徴とするポリヌクレ  
オチド中の特定塩基配列の検出法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は変性された新規DNAおよびその用途  
に関する。生化学研究において放射性同位元素を用いる突  
破は敏感な方法として広く利用されている。しかし放射線の危険性や廃棄物処理などに莫大な配慮が  
要求され、これらの実験を行う上には莫大な費用  
と特殊な空間を要する。さらに $^{32}\text{P}$ および $^{125}\text{I}$   
などの半減期は短かく、これらを含有する試薬は  
保存がきかないため用事調整といつた不便さがつ  
きまとう。一方、現在分子生物学において特定の遺伝子の  
検出あるいは同定のために、それらと相補的な塩  
基配列を持つデオキシヌクレオチド(以下DNA  
と略記することがある)あるいはRNAフラグメ  
ントによる核酸ハイブリッド形成法が採用されて  
いる。現在この方法は主として $^{32}\text{P}$ を使用してい  
るが、その短い寿命故に基礎研究のみに限定され、  
病院などにおける臨床検査の一手段としては利用  
されていない。ウイルス遺伝子あるいは診断に値する異常染色  
体など特定DNA配列を簡便かつ迅速に検出する  
ことは臨床において特に重要であり、ある種のウ  
イルス性疾患のように抗原が検出されない場合で  
も、生体組織中のウイルスゲノムを直接検出する

ことが望まれている。

最近、非放射性免疫診断法は充分放射性免疫診断法に匹敵することが示されているが、本発明者らは蛍光免疫アッセイや酵素免疫アッセイの手法を核酸ハイブリッド形成法と結合させることにより高感度の特異遺伝子診断法を開発できると考え、鋭意研究を行い本発明を完成した。

すなわち本発明は、5'末端のリン酸部に直接またはリガンドを経てハプテンを結合せしめてなるポリデオキシヌクレオチド、ならびに該ポリデオキシヌクレオチドを細胞中あるいは支持体に固定された試料中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせ該ハイブリッドに免疫学的手法で蛍光または酵素標識を導入し、光検出または基質反応によつて生じる光応答を検知することを特徴とするポリヌクレオチド中の特定塩基配列の検出法を提供するものである。

上記変性されたポリデオキシヌクレオチドに関し、ハプテンは低分子であつても抗原性を有するものであればいずれでもよいが、ハプテンに対す

る抗体の入手容易性から2, 4-ジニトロフェニルなどのジニトロベンゼン誘導体、ビオチノイル、イミノビオチノイルなどビオチン誘導体、アルドステロン、17-β-エストラジオール、テストステロンなどステロイド類、ジフェニルヒダントインなどヒダントイン誘導体が挙げられ、とりわけ2, 4-ジニトロフェニルが好ましい。

ハプテンは直接ポリデオキシヌクレオチドの5'末端のリン酸部に結合していてもよいが、リガンドを経てポリデオキシヌクレオチドの5'末端のリン酸部に結合していることが好ましい。該リガンドとしては、式-A-Z-（式中、Aは結合手または式-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-（XはO、NHまたは結合手を、nは1～8の整数を示す）を、ZはOまたはNHを示し、ハプテンはAに、ヌクレオチドの5'末端リン酸部はZに結合している）で表わされる基が挙げられる。なかでもリガンドとして式、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH-（nは上記と同意義）であるものが好ましく、とりわけnが2であるものが好ましい。

上記ポリデオキシヌクレオチド（以下、ポリDNAと略称することがある）は、検出対象となる遺伝子、ウイルスなどのポリヌクレオチドの特定塩基配列に相補的なポリDNAである。該ポリDNAは塩基数として8以上、好ましくは12～1,000である。

上記ポリDNAに関し、ポリDNAの鎖長の短いものは公知の化学合成によつて大量に得ることも容易である。鎖長の短いものは、ハイブリッド形成能の点で劣るため、含有量の高いものが望ましい。一般にゲノムの特定の箇所を特異的に検出する場合には比較的鎖長の短いものがふさわしく、鎖長の長いプローブはゲノムの広領域にわたつて同定・検出する場合には有用であるが、若干特異性を欠く傾向にある。

比較的長い鎖長のプローブは、クローニングされたDNAを二本鎖のまま制限酵素によつて切り出されるが、ここで得られる異つた鎖長フラグメントはゲル電気泳動などで分離して使用されてもよいが、混合物のままハプテン化しても有利に使

用できる。

本発明の変性されたDNAを、例えばB型肝炎ウイルスの存在を検出するために用いる場合、ポリDNAとして例えば、表面抗原蛋白遺伝子とコア蛋白遺伝子との間に存在する塩基配列に相補的なTCTTATGTAAAGACCTであるか、B型肝炎ウイルスDNAを制限酵素Sau3Aで分解して得られる平均200塩基対のポリDNAであることが好ましい。

本発明の変性されたDNAは、完全なポリDNAに、所望によりリガンドを有するハプテン化試薬を反応させるかまたはハプテンを有するポリDNAの一部を残りのポリDNAまたはDNAと結合させることにより製造できる。

具体的には、例えば2, 4-ジニトロフェニルエチレンジアミンやビオチンなどハプテン化試薬とポリDNAとを縮合して製造することができる。

ハプテン化試薬の有するアミノ基をポリDNAのリン酸残基と反応させる場合は、トリフェニルホスフィンと2, 2'-ジビリミジンジスルフィド

(I)  $(\text{PhNH})_2\text{P}-\text{O}-\text{TCTT}$  の合成:

5'保護基を除いたトリマー (CTT) 100mg と 3'-磷酸の保護基を除いた  $(\text{PhNH})_2\text{P}-\text{O}-\text{T}$  50mg とを乾燥ピリジン 1ml 中メシレンスルホンニトロトリアゾール (MSNT) 70mg の存在下 1時間融合。反応液に少量の水を加え、濃縮乾固。残渣をアセトンに溶解し、白濁するまで水を加えたのちクロロプレツプ RP-8 (メルク社) 30g のカラムに吸着させ、アセトン-酢酸トリエチルアミン (0.01M) 3:2V/V 混液 100ml で洗い、次いで上記 7:3V/V 混液 100ml で溶出される分画を濃縮乾固。残留物を少量のクロホルムに溶解し、これをシクロヘキサン中に滴下して得られる沈殿を遠心分離し、白色粉末 84mg を得た。

(II)  $(\text{PhNH})_2\text{P}-\text{O}-\text{TCTTATGT}$  の合成:

(I)の方法で得られたテトラマー 40mg と常法によつて合成された A T O T 40mg とを常法通り MSNT 100mg で融合させ、(I)の方法と同様にし、粉末状の目的物 60mg を得た。

緩急溶解法、0.15M (15%エタノール含有) から 0.3M (30%エタノール含有) まで 10分間で変化) において最も速く溶出される主分画を分取し、SEP-PAGE (ウォーターズ) で脱塩し、逆相高速液体クロマトグラフィー (スクレオシム-C<sub>18</sub>) で単一のピークを示すもの 350μl を得た。本品は細菌のアルカリホスファターゼで 5'位を脱磷酸したのち、<sup>32</sup>Pで 5'位を標識した ATP とポリスクレオチドキナーゼで 5'位を放射標識し、マキサム-ギルバート法によつて目的とする塩基配列に一致することを確認した。

## 実施例 3

実施例 2) で得たペンタデカマー 850μg を水 30μl に溶解。ここに 2, 4-ジニトロフェニルエチレンジアミン 13mg の N, N-ジメチルホルムアミド溶液 300μl を加え、更に 0℃ で トリフェニルホスフィン 39mg と 2, 2'-ジビリジリジルスルフィド 33mg を加えた。その後同温度で 1時間毎にトリフェニルホスフィンと 2, 2'-ジビリジリジルスルフィドを一回目と同量さらに

(III)  $(\text{PhNH})_2\text{P}-\text{O}-\text{TCTTATGTAAAGACCTOBz}$ 

の合成 (完全保護ペンタデカマー):

(II)の方法で得たオクタマー 40mg と 3'末端の水酸基がベンゾイル基で保護されたペンタマー AA GACCTOBz 40mg とを MSNT 100mg を用いて融合し、常法に従つて目的物 60mg を単離した。

## (IV) 完全保護ペンタデカマーの保護基除去:

完全保護ペンタデカマー 60mg を酢酸-トリエチルアミン混液 (2:1V/V) 1.5ml に溶解。亜硝酸イソアミル 0.15ml を加え 35℃ で 7時間攪拌。反応液を濃縮乾固したのち、ピリジンを加えて再度濃縮し、亜硝酸イソアミルを完全に除去。残渣に濃アンモニア水 5ml を加え 25℃ で 20時間密封放置したのち、60℃ で 4時間加熱。アンモニア水を留去し、残渣を 0.01M 炭酸トリエチルアミンに溶かし、エーテルで 2回洗浄。次にセファデックス G-50 で最初に溶出される分画を分取し、続いてイオン交換高速液体クロマトグラフィー (パーナシム S A X-10, φ 0.4 × 30cm, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 緩衝液 (pH 6.3) による直

2度にわたつて加え、反応液に水 2ml を加え、酢酸エタノール 2ml で 2度洗浄した。水層を濃縮乾固し、残渣を少量の 0.01M 炭酸トリエチルアミンに溶かし、セファデックス G-50、次いで高速液体クロマトグラフィー (パーナシム S A X-10) によつて精製し、200μg の黄色粉末として、2, 4-ジニトロフェニル-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-PO<sub>2</sub>-TCTTATGTAAAGACCT (DNA プローブ) を得た。

## 実施例 4

B型肝炎ウイルス Adw の全遺伝子を含む pBR 322 由来のプラスミド pBR322-EcoRI/HBV 933 (特開昭 58-194897号公報参照) 1μg を EcoRI で切断し、アガロース電気泳動に付し、臭化エチジウムで蛍光染色すると二本のバンドが検出された。分子量の大きいバンド (ウイルスゲノムを含む) をニトロセルロースに転位させ、セルロース上に固定された DNA を 80℃ で 3時間加熱変成させ、フィルターを実施例 3 で得られた DNA プローブ 2μg と緩衝液 200μl

など脱水触媒の存在下反応させることができ、通常N、N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、水やこれらの混合物など極性溶媒中を行う。反応温度は-10~10℃である。

ハプテン化試薬の有するカルボキシル基を反応させる場合は、酸ハロゲン化物として用いることが好ましい。

かくして得られる本発明の変性されたDNAは、抽出、カラムクロマトグラフィー、再結晶、再沈殿など通常の化学的操作により分離、精製することができる。

本発明の変性されたDNAは低毒性であり、安全に、例えば以下の用途に用いることができる。

本発明の変性されたDNAを用いるポリヌクレオチド中の特定塩基配列の検出は、例えば以下の方法によつて行うことができる。

検出しようとするポリヌクレオチドを常法によりニトロセルロースフィルター等の支持体に固定し、所望によりアルカリ、加熱等により変性させ、一本鎖ポリヌクレオチドとする。

ヌクレオチド中の特定塩基配列の有無を知ることができる。基質としては過酸化水素など、発色剤としてはオルトジアニソジンなどを例示することができる。

本発明の変性されたDNAを用いるポリヌクレオチド中の特定塩基配列の検出法により、B型肝炎ウイルス(HBV)、成人白血病ウイルス(ATLV)、人白血球抗原(HLA)等の遺伝子を検出することができ、B型肝炎や成人白血病の診断やHLA型判定のために有用である。

具体的には、診断の対象となる動物(マウス、イヌ、ヒトなど)の血清等を用い本発明の如き実施例6記載の方法や公知(例えば、プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス USA 第79巻、7522-7526頁、1982年)の方法に準じて行うことができる。

本発明の如き記号の意義は以下のとおりである。

A:デオキシアデニン塩基 C:デオキシチミジン塩基  
T:チミジン塩基 Ph:フェニル  
G:デオキシグアニン塩基 Bz:ベンゾイル

以下実施例によつて本発明を具体的に説明する

上記ヌクレオチドを固定したフィルターとハプテン化されたDNA(DNAプローブ)を緩衝液中でハイブリダイズさせる。

上記処理したフィルターを、トリス-塩酸、ヒトアルブミン等を含有する食塩水で洗浄し、ウサギ抗ジニトロフェニル-牛血清アルブミン(ウサギ抗DNP-BSA)など抗ハプテンIgGあるいは抗血清と反応させる。抗ハプテンIgG等は、ヒトアルブミンやヤギ血清を含む希釈食塩水として用いることが好ましい。

食塩水等で洗浄後、該反応させたフィルターを西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ウサギIgG抗体など各種ペルオキシダーゼやルソフェラーゼで酵素標識した抗IgG抗体やエタノールヌクレオチド、アミノヘキサンアデノシンヌクレオチドなどで蛍光標識した抗IgG抗体と反応させる。該反応はヒトアルブミンやヤギ血清等の共存する食塩中で行うことが好ましい。

上記反応したフィルターを光励起または基質添加して、生ずる光応答を検知することによりポリ

が、本発明はこれらに制限されるものではない。

実施例中、保護されたヌクレオチドの保護基は、5'位についてはジメトキシトリチルであり、リン酸についてはp-クロロフェニルとβ-シアノエチルである。

#### 実施例1 (PhNH)<sub>2</sub>P<sup>0</sup>-OTの合成:

5'位を脱保護した保護T460mgと1-メチルイミダゾール120μlをピリジン10mlに溶解し、ジフェニルアミノ燐酸クロリド400mgを加えた。6時間後と20時間後に上記燐酸化剤400mgと1-メチルイミダゾール120μlを追加し、4時間後に1M酢酸カリウム5mlを加えて10分間攪拌。反応液にクロロホルム20mlを加えて抽出し、クロロホルム層を0.5M燐酸二水素カリウム、次いで水で洗い、濃縮乾燥。残留物をシリカゲル300を用い、CHCl<sub>3</sub>-MeOH(97:3)で精製し、目的物370mgを得た。Rf=0.11(キーゼンゲル 60F-254、メルク社、クロロホルム-メタノール 19:1V/V)

実施例2

中でハイブリダイズさせた。セルロースを3%のヒト・アルブミンを含む食塩水(9% NaClの10 mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.4)に浸し、食塩水で洗い、ウサギ抗DNP-BSA血清(10倍希釈)の3%ヒト・アルブミン、10%ヤギ血清を含む食塩水希釈液に2時間浸した。食塩水で5回洗い、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ウサギIgG抗体(200倍希釈)の3%ヒト・アルブミン、10%ヤギ血清を含む食塩水に2時間浸した。再び食塩水で5回洗い、0.0025%オルトジアニジン、0.01%過酸化水素(10 mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.4)に30分間浸し、水洗、乾燥すると、ウイルスゲノムを含むバンドのみ赤褐色を呈し、pBR322由来のバンドは全く着色しなかった。

#### 実施例5

プラスミドpBR322にB型肝炎ウイルスDNAを組み込みクローニングして得られるプラスミドpBR322-EcoRI/HBV933(前出)2.3μgを制限酵素EcoRIで消化し、アガロースゲル電

気泳動で分離精製し、肝炎ウイルスDNA(470μg)を得た。この内390μgを制限酵素Sma3Aで分解後、精製して平均200塩基対のDNAフラグメントを含む混合物(220μg)を得た。このDNAのうち50μgを2,4-ジニトロフェニルエチレンジアミン(13.5μg)と共にN,N-ジメチルホルムアミド(300μg)-水(30μg)の混合液に溶かし、氷冷下にトリフェニルホスフィン(39μg)と2,2'-ジピリミジンジスルフィド(33μg)を加えた。後2者の試薬を1時間毎にさらに2回加え、最後に加えてから1時間後に水(1ml)と酢酸エチル(4ml)を加えて抽出した。水層を濃縮し、この溶液をセファデックスQ-25のカラム(0.6×25cm)の上端に注いだ。カラムを0.15Mの食塩を含むトリス・塩酸緩衝液(20ミリモル濃度、pH 8.0)で展開し、最も早く溶出するピークを採めた。エタノール沈殿により、2,4-ジニトロフェニルで修飾されたDNA混合物(40μg)を得た。ニトロセルロースフィルターにプラスミド

pBR322-EcoRI/HBV933の塩々の濃度の希釈水溶液をスポットし、80℃、3時間加熱乾燥し、次いでこのフィルターを常法どおりハイブリダイゼーションの前処理に付した。前述のジニトロフェニルエチレンジアミンでハプテン化したDNA(1μg)をプローブとし、400μgの溶液中、40℃16時間、フィルター上に固定したDNAとハイブリダイゼーションさせた。以後、実施例4と同様の酵素免疫法の諸過程を施した。その結果フィルター上の1ナノグラムのpBR322-EcoRI/HBV933のスポットにまで明らかな発色が認められた。

#### 実施例6

B型肝炎表面抗原キャリアーの血清(300μg)を2%のドデシル硫酸ナトリウム、サケ精級DNA(40μg/ml)およびプロテインゼン(2μg/ml)を含む150 mM 食塩/10 mM EDTA/10 mM トリス塩酸(250μg)の中に加え、37℃で4時間インキュベートしたのち、導容の上記緩衝液を中和したフェノール、次いでクロロ

ホルム/イソアミルアルコール(24:1)で洗う。1/10容の3M酢酸ナトリウムと2倍容のエタノールを用いてDNAを沈でんせしめ、乾燥する。これを0.3M水酸化ナトリウム(10μg)で室温下10分間変性させ、2M酢酸アンモニウム(10μg)で中和し、ニトロセルロース・フィルター上にスポットする。常法通りのハイブリダイゼーションの前処理に付した後、ハプテン化DNA(1μg、400μg)を用いて実施例5と同様に処理するとスポットは特有の赤褐色を呈する。

代理人 井理士 天井作次

